

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Korana Cindrić

UTJECAJ ANTIOKSIDANASA NA STABILIZACIJU MJEŠAVINE
LJEŠNJAKOVOG ULJA I ULJA KOŠTICE GROŽĐA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, ožujak 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za prehrambeno inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij prehrambenog inženjerstva**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Tehnologija ulja i masti**Tema rada** je prihvaćena na I. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. održanoj 30. listopada 2018.**Mentor:** prof. dr. sc. *Tihomir Moslavac***Pomoć pri izradi:** *Daniela Paulik*, tehnički suradnik**Utjecaj antioksidanasa na stabilizaciju mješavine lješnjakovog ulja i ulja koštice grožđa***Korana Cindrić, 415-DI*

Sažetak: U ovom radu određena je oksidacijska stabilnost mješavine biljnih ulja. Ispitana je oksidacijska stabilnost mješavine hladno prešanog lješnjakovog ulja i hladno prešanog ulja koštice grožđa (70:30) bez dodatka antioksidansa, te sa dodatkom prirodnih i sintetskih antioksidanasa uz dodatak limunske kiseline. Parametri kvalitete ulja (peroksidni broj, slobodne masne kiseline) određeni su primjenom standardnih metoda. Prirodni antioksidansi koji su korišteni u ovom ispitivanju su: ekstrakt nara, ružmarina i kadulje, udjela 0,2 %, mješavina tokoferola udjela 0,2 % te eterična ulja konopljike, lavande, smilja, slatkog pelina i divlje mrkve udjela 0,05 %. Kao sinergist korištena je limunska kiselina udjela 0,01 %. Kao sintetski antioksidans korišten je propil galat u udjelu 0,01 %. Oksidacijska stabilnost mješavine ulja ispitivana je Oven testom na temperaturi od 63 °C tijekom 4 dana. Kroz rezultate ispitivanja prikazana je vrijednost peroksidnog broja za pojedinačni uzorak. Ekstrakt ružmarina pokazao je najbolju zaštitu mješavine ulja od oksidacije, dok ekstrakt nara i mješavina tokoferola ne pokazuju zaštitu mješavine ulja. Dodatkom eteričnog ulje smilja postignuta je najbolja zaštita mješavine ulja, dok podjednako dobru zaštitu pokazuju eterično ulja lavande i slatkog pelina. Limunska kiselina djeluje kao sinergist uz ekstrakt ružmarina zbog čega je postignuta najbolja zaštita mješavine ulja od oksidacijskog kvarenja.

Ključne riječi: Biljna ulja, antioksidansi, oksidacijska stabilnost, sinergist, Oven test

Rad sadrži: 52 stranica
10 slika
15 tablica
0 priloga
43 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- | | |
|--|---------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. <i>Vedran Slačanac</i> | predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. <i>Tihomir Moslavac</i> | član-mentor |
| 3. doc. dr. sc. <i>Antun Jozinović</i> | član |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Stela Jokić</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 25. ožujak 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food technologies
Subdepartment of Food Engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Technology of Oils and Fats

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. I. held on October 30, 2018.

Mentor: *Tihomir Moslavac*, PhD, full prof.

Technical assistance: *Daniela Paulik*, technical associate

The Effect of Antioxidants on the Stabilization of Mixture of Hazelnut Oil and Grape Seed Oil

Korana Cindrić, 415-DI

Summary: In this study the oxidative stability of mixture consisted of vegetable oils was determined. The oxidative stability of mixture of cold-pressed walnut oil and cold pressed grape seed oil (70:30) was tested without the addition of antioxidants, and with the addition of natural and synthetic antioxidants with added synergist citric acid. The oil quality parameters (peroxide number, free fatty acids) was determined by using standard methods. The natural antioxidants used in this study are: pomegranate extract, rosemary and sage extract, 0.2%, a mixture of 0.2% tocopherol and essential oils of hemp, lavender, immortelle, sweet wormwood and wild carrot 0.05%. As a synergist, the citric acid content was 0.01%. As a synthetic antioxidant, propyl galate was used in the share of 0.01 %. Oxidative stability of the oil mixture was tested by the Oven Test at a temperature of 63 °C for 4 days. The test results show the peroxide number for the individual sample. Rosemary extract showed the best protection of the oil blend from oxidation, while the pomegranate extract and tocopherol blend show no protection for the oil blend. The best protection of oil blend is achieved by the addition of essential immoretelle oil, while equally good protection is shown by lavender and sweet wormwood essential oils. The best protection against oil oxidation for this mixture of oils was by citric acid which acts as a synergist with rosemary extract.

Key words: Vegetable oil, antioxidants, oxidation stability, synergists, Oven test

Thesis contains: 52 pages
10 figures
15 tables
0 supplements
43 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. <i>Vedran Slačanać</i> , PhD, full prof. | chair person |
| 2. <i>Tihomir Moslavac</i> , PhD, full prof. | supervisor |
| 3. <i>Antun Jozinović</i> , PhD, assistant prof. | member |
| 4. <i>Stela Jokić</i> , PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: March 25, 2019

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Tihomiru Moslavcu na mentorstvu u ovom diplomskom radu.

Hvala Vam na svim savjetima te izdvojenom trudu i vremenu.

Također, hvala i tehničarki Danieli Paulik na strpljenju i pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji, osobito roditeljima i sestrama koji su mi omogućili studiranje i bili uz mene tijekom cijelog mog školovanja.

Hvala svima koji su bili uz mene u lijepim i teškim trenucima tijekom ovog perioda života.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. JESTIVA BILJNA ULJA	4
2.2. PODJELA I SVOJSTVA BILJNIH ULJA	8
2.2.1. Lješnjak	9
2.2.1.1. Lješnjakovo ulje	10
2.2.2. Koštice grožđa	11
2.2.2.1. Ulje koštica grožđa.....	11
2.3. VRSTE KVARENJA BILJNIH ULJA	12
2.3.1. Mikrobiološki i enzimski procesi kvarenja	13
2.3.2. Kemijski procesi kvarenja	15
2.4. STABILIZACIJA BILJNIH ULJA	17
2.4.1. Antioksidansi	18
2.4.2. Sinergisti	20
2.4.3. Prooksidansi.....	21
2.5. METODE ODREĐIVANJA STUPNJA OKSIDACIJE ULJA	22
2.5.1. Senzorske metode	23
2.5.2. Kemijske metode	23
2.5.3. Fizikalne metode.....	24
2.6. OKSIDACIJSKA STABILNOST ULJA	25
2.6.1. Oven test (Schaal Oven test)	26
2.6.2. AOM test (Active oxygen method) ili Swift test	27
2.6.3. Rancimat test.....	27
2.6.4. Test održivosti na 98 °C	28
3. EKSPERIMENTALNI DIO	29
3.1. ZADATAK	30
3.2. MATERIJAL I METODE	30
3.2.1. Materijali	30
3.2.1.1. Lješnjakovo ulje	31
3.2.1.2. Ulje koštica grožđa	31
3.2.1.3. Antioksidansi	31
3.2.2. Metode rada.....	35
3.2.2.1. Priprema uzorka za analizu.....	35
3.2.2.2. Određivanje parametara kvalitete ulja.....	37
3.2.2.3. Određivanje oksidacijske stabilnosti mješavine ulja Oven testom na 63 °C	39
4. REZULTATI.....	41
5. RASPRAVA.....	45

6. ZAKLJUČCI	47
7. LITERATURA	49

Popis oznaka, kratica i simbola

Abr	Anisidinski broj
AH	Antioksidans
AOM	Active Oxygen Method
BHA	Butilhidroksianisol
BHT	Butilhidroksitoluen
$\text{HOO}\bullet$	Radikal vodikovog peroksida
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Natrijev tiosulfat
OOO	triglicerid
OOL	triglicerid
POO	triglicerid
Pbr	Peroksidni broj
$\text{R}\bullet, \text{RO}\bullet$	Slobodni radikal
RH	Masne kiseline
$\text{ROO}\bullet$	Radikal peroksida
ROOH	Hidroperoksid
RR, ROOR	Polimeri
SMK	Slobodne masne kiseline
TBHQ	Tercijarni butilhidrokinon
Tbr	Tiobarbiturni broj

1. UVOD

Kod proizvodnje prehrambenih proizvoda izuzetno je bitno dobiti krajnji proizvod koji zadovoljava zahtjeve kvalitete i zdravstveno je ispravan. U današnje vrijeme povećana je konzumacija jestivih biljnih ulja, zbog čega je potrebno osigurati takvu proizvodnju i skladištenje biljnih ulja koja neće narušiti nutritivne vrijednosti niti biološke sastojke ulja. Jestiva biljna ulja su podložna kvarenju i imaju ograničen rok trajanja. Kvarenje biljnih ulja najčešće je uzrokovano oksidacijom ugljikovog lanca masne kiseline što predstavlja oksidacijsko kvarenje, koje dovodi do organoleptičkih promjena svojstava ulja i gubitka biološki aktivnih tvari. Upravo zbog toga prilikom proizvodnje i skladištenja biljnih ulja potrebno je spriječiti oksidacijsko kvarenje ili ga kao takvo usporiti.

Vrijeme kroz koje se ulje može sačuvati od procesa autooksidacije i kvarenja predstavlja oksidacijsku stabilnost ili održivost ulja. Stupanj oksidacije ulje danas se može odrediti pomoću više različitih metoda za ispitivanje održivosti ulja, koje se temelje na ubrzanoj oksidaciji ulja. Pri tome se koriste ove metode: Schaal Oven test, AOM test, test održivosti na 98 °C, Rancimat test, metoda apsorpcije O₂ i test na bazi fluorescentnog svjetla (Dimić i Turkulov, 2000.). Sastav masnih kiselina u pojedinoj vrsti ulja, te udio prirodnih antioksidanasa u samom ulju ima utjecaj na oksidativnu stabilnost ulja (Frega i sur., 1999.).

Antioksidansi koji se dodaju uljima radi poboljšanja oksidacijske stabilnosti, mogu se podijeliti na prirodne i sintetske.

Zadatak ovog rada bio je pomoću Oven testa koji se temelji na ubrzanoj oksidaciji ulja ispitati utjecaj dodatka antioksidanasa na oksidacijsku stabilnost mješavine hladno prešanog lješnjakovog ulja (70 %) i hladno prešanog ulja koštica grožđa (30 %).

Oven test se provodio pri temperaturi 63 °C, kroz četiri dana. Pratila se oksidacijska stabilnost na uzorku mješavine biljnih ulja bez dodatka antioksidansa (kontrolni uzorak). U ostalim uzorcima pratio se utjecaj dodatka prirodnih antioksidanasa: ekstrakta kadulje (1:10, 65 % EtOH – UZV, udjela 0,2 %), ekstrakta ružmarina (OxyLess.CS, udjela 0,2 %), ekstrakta ružmarina (OxyLess.CS, udjela 0,2 %) s dodatkom 0,01 % limunske kiseline, ekstrakta nara (0,2 %), mješavina tokoferola (0,2 %), kao i dodatak eteričnih ulja: konopljike (0,05 %), lavande (0,05 %), slatkog pelina (0,05 %), divlje mrkve (0,05 %), smilja (0,05 %) te sintetskog antioksidansa propil galata (0,01 %) na promjenu stabilnosti mješavine ulja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. JESTIVA BILJNA ULJA

Masti i ulja su organski spojevi i svrstavaju se u skupinu lipida, te se sastoje od masnih kiselina, trovalentnog alkohola glicerola i negliceridnih sastojaka (Moslavac, 2013.). Zbog svog sastava masti i ulja se dobro otapaju organskim u otapalima kao što su: eter, alkohol, heksan, dietil eter, ekstrakcijski benzen, kloroform i dr. dok su u vodi netopljiva (Sikorski, 2003.).

Prema sastavu i strukturi biljnim uljima kao prirodni lipidi se mogu podijeliti u sljedeće skupine:

- jednostavni lipidi: trigliceridi masnih kiselina i voskovi;
- složeni lipidi: fosfolipidi, glikolipidi, aminolipidi, cerebrosidi, sulfolipidi i
- derivati lipida: masne kiseline, alkoholi (steroli), ugljikovodici (karoteni), vitamini A, D, E i K (Rac, 1964.).

Jednostavni lipidi

Jednostavnim lipidima pripadaju triacilgliceroli (trigliceridi) masnih kiselina koji u prirodi dolaze uz prisustvo manjih količina lipida iz drugih grupa, te voskovi poznati kao esteri viših masnih kiselina i viših masnih alkohola (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Triacilgliceroli su esteri koji nastaju esterifikacijom trovalentnog alkohola glicerola i masnih kiselina. Reaktivni dio molekule triacilglicerola su masne kiseline zbog čega imaju utjecaj na kemijska i fizikalna svojstva ovih spojeva (Swern, 1972.).

Složeni lipidi

Složeni konjugirani lipidi mogu procesom hidrolize dati tri ili više komponenata, koje uključuju: fosfolipide koji su derivati fosforne kiseline, glikolipide koji u sastavu sadrže ostatke ugljikohidrata, aminolipide, cerebroside i sulfolipide. Negliceridni sastojci u prirodnim biljnim uljima najčešće se nalaze u udjelu 1 - 2 %, izuzetak je sojino i pamukovo ulje koja mogu sadržavati i do 3,5 % (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.). Određeni negliceridni sastojci su izrazito poželjni u biljnim uljima, ali isto tako postoje i drugi izrazito nepoželjni negliceridni sastojci koje je potrebno ukloniti prilikom rafinacije u što većoj mjeri. Karoteni i liposolubilni

vitamini su poželjni sastojci dok za razliku od toga voskovi, fosfatidi i tragovi metala su nepoželjni jer doprinose smanjenju kvalitete ulja.

Derivati lipida

Osim masnih kiselina u derivate lipida ubrajamo i alkohole (sterole), ugljikovodike (karotenide), te vitamin A, D, E i K.

Postoje razlike između pojedinih masnih kiselina, a ovise o:

- stupnju nezasićenosti ugljikovih molekula,
- broju atoma u molekuli,
- broju dvostrukih veza i
- položaju kiselinskih ostataka u prostoru oko dvostrukih veza.

Ovisno o broju ugljikovih atoma, podjela masnih kiselina je sljedeća:

- masne kiseline koje imaju do 8 ugljikovih atoma ili kratkolančane masne kiseline,
- masne kiseline koje imaju od 8 do 12 ugljikovih atoma ili srednjelančane masne kiseline i
- masne kiseline koje imaju iznad 12 ugljikovih atoma ili dugolančane masne kiseline.

Masne kiseline se prema stupnju nezasićenosti mogu podijeliti na :

- zasićene masne kiseline i
- nezasićene masne kiseline (Swern, 1972.).

Zasićene masne kiseline

Zasićene masne kiseline su masne kiseline u čijem sastavu su atomi ugljika povezani jednostrukim vezama (C – C), te je svaki C atom u lancu molekule zasićen. $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ je opća formula zasićenih masnih kiselina. Zasićene masne kiseline imaju ravan oblik lanca zbog čega se gusto slažu. Pri sobnoj temperaturi takve masti imaju kruto agregatno stanje, a točka topljenja raste s porastom broja C atoma u molekuli (Rade i Škevin, 2004.). Zasićene masne kiseline zastupljene su u prirodnim mastima i uljima imaju najčešće 4 - 22 C atoma u svome

sastavu, a zastupljenost zasićenih masnih kiselina s većim brojem C atoma (24 - 26) prisutna je u voskovima (Moslavac, 2013.).

Neke od važnijih zasićenih masnih kiselina prikazane su u **Tablici 1**. Laurinska, stearinska, palmitinska i miristinska su zasićene masne kiseline koje se ističu kao najzastupljenije u mastima i uljima. Prisustvo zasićenih masnih kiselina sa neparnim brojem ugljikovih atoma je u tragovima (Sadadinović, 2008.).

Tablica 1 Značajnije zasićene masne kiseline (Moslavac, 2013.)

Naziv	Broj C atoma	Formula	Mol. težina	Talište (°C)	Nalazište
Maslačna (n-butanska)	4	$\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_2 \cdot \text{COOH}$	88,10	-7,9	maslac
Kaprinska (n-heksanska)	6	$\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_4 \cdot \text{COOH}$	116,15	-3,4	maslac, masti kokosa, babasu, palme i sl.
Kaprilna (n-oktanska)	8	$\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_6 \cdot \text{COOH}$	144,21	16,7	maslac, masti kokosa, palmi i sjemenja uljarica
Kaprinska (n-dekanska)	10	$\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_8 \cdot \text{COOH}$	172,26	31,6	maslac, masti kokosa i kitova
Laurinska (n-dodekanska)	12	$\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_{10} \cdot \text{COOH}$	200,31	44,2	sjemenske masti iz porodica lovora i palme, mliječne masti
Miristinska (n-tetradekanska)	14	$\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_{12} \cdot \text{COOH}$	228,36	53,9	većina životinjskih i biljnih masti
Palmitinska (n-heksadekanska)	16	$\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_{14} \cdot \text{COOH}$	246,42	63,1	praktički sve životinjske i biljne masti
Stearinska (n-oktadekanska)	18	$\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_{16} \cdot \text{COOH}$	284,47	69,6	svagdje gdje je prisutna palmitinska kiselina
Arahinska (n-eikosanska)	20	$\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_{18} \cdot \text{COOH}$	312,52	75,3	arašidovo i riblja ulja
Behenska (n-dokosanska)	22	$\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_{20} \cdot \text{COOH}$	340,57	79,9	arašidovo, repičino, gorušičino ulje
Lignocerinska (n-tetrakonsanska)	24	$\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_{22} \cdot \text{COOH}$	368,62	84,2	arašidovo ulje, u malim količinama u životinjskim mastima
Ceritonska (n-heksakosanska)	26	$\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_{24} \cdot \text{COOH}$	396,68	87,7	Pčelinji i drugi voskovi

Nezasićene masne kiseline

Masne kiseline u čijem sastavu su ugljikovi atomi osim, jednostrukim vezama međusobno povezani sa jednom ili više dvostrukih ugljikovih veza nazivaju se nezasićenim masnim kiselinama. Prema broju dvostrukih veza ($C=C$) nezasićene masne kiseline dijele se u dvije skupine:

- mononezasićene masne kiseline
- polinezasićene masne kiseline

Mononezasićene masne kiseline sadrže jednu dvostruku vezu, dok polinezasićene masne kiseline u svome sastavu imaju dvije ili više dvostrukih veza (Rac, 1964.; Rade i Škevin, 2004.). Oblik lanca nezasićenih masnih kiselina nije ravan, već je oblik slomljenog štapića što utječe na agregatno stanje ulja. Ulja (maslinovo ulje, suncokretovo ulje, sojino ulje, ulje uljane repice i dr.) su u tekućem obliku na sobnoj temperaturi jer imaju niže talište u usporedbi s zasićenim masnim kiselinama sa jednakim brojem ugljikovih atoma u lancu (Rac, 1964.). Najzastupljenija mononezasićena masna kiselina u svim biljnim uljima je oleinska kiselina sa 18 – C atoma koja posjeduje jednu dvostruku vezu u svome sastavu. Velike količine oleinske kiseline zastupljene su u maslinovom, viskooleinskom suncokretovom i repičinom ulju (Moslavac, 2013.).

Linolna kiselina je jedna od najznačajnijih polinezasićenih masnih kiselina koja u svome sastavu ima dvije dvostruke veze. Linoleinska kiselina u svome sastavu ima tri dvostruke veze, dok se sa četiri dvostruke veze kao najznačajnija spominje arahidonska kiselina. Linolna i linoleinska su polinezasićene masne kiseline koje se mogu izdvojiti kao najzastupljenije u brojnim uljima poput: suncokretovog, sezamovog, kukuruznog ulja i dr. (Rac, 1964., Sadadinović, 2008.). Neke od značajnijih mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina navede su **Tablicama 2 i 3.**

Tablica 2 Značajnije mononezasićene masne kiseline (Moslavac, 2013.)

Naziv	Formula	Nalazište
Oleinska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	sva ulja i masti
Palmitoleinska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	prirodne masti
Vakceinska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	maslac i loj
Gadoleinska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	ulje repice, gorušice i riblja ulja
Petroselininska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	ulje peršina
Eruka kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	ulje krstašica (repica, gorušica)

Tablica 3 Značajnije polinezasićene masne kiseline (Moslavac, 2013.)

Naziv	Formula	Nalazište
Linolna kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	sva ulja i masti (0,5-81 %), veći broj jestivih biljnih ulja (40-60%)
Linolenska kiselina	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	ulja visokog jodnog broja (>150), tzv. sušiva ulja
Klupanodonska kiselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2\text{CH}_2\text{COOH}$	riblja ulja

2.2. PODJELA I SVOJSTVA BILJNIH ULJA

Svojstva biljnih ulja karakteristična su za svaku pojedinu biljnu vrstu iz kojeg se proizvodi biljno ulje. Biljna ulja mogu se podijeliti na više različitih skupina ovisno o podrijetlu biljke iz koje je proizvedeno biljno ulje ili dijelu biljke koji se koristi za proizvodnju biljnog ulja.

Prema tome razlikujemo sljedeće:

1. Ulja i masti iz mesnatog dijela ploda: palmino ulje, maslinovo ulje, avokadovo ulje i dr.,
2. Ulja i masti prema dominirajućim masnim kiselinama iz sjemena i ploda dijele se na sljedeće:
 - a) laurinske masti i ulja (palmine koštice, kokos...),
 - b) masti stearinske i palmitinske kiseline (shea maslac, kakao maslac,...),

- c) ulje palmitinske kiseline (pamukovo ulje, palmino ulje,...),
- d) ulje linolne i oleinske kiseline (suncokretovo, sezamovo, kukuruzne klice, šafranika, bučine koštice, repica...),
- e) ulje linolenske kiseline (soja, lan, konoplja, *Camelina sativa* L.)

3. Ulja prema podrijetlu odnosno vrsti biljke:

- a) ulje iz leguminoza (soja, kikiriki...),
- b) ulja krstašica (gorušica, repica...) (Bockisch, 1998.).

2.2.1. Lješnjak

Običan europski lješnjak *Corylus avellana* L. je drvo koje pripada porodici *Betulaceae*, čiji plodovi imaju visok udio ulja. Zemlje koje najviše doprinose ukupnoj svjetskoj proizvodnji lješnjaka su: Turska, Španjolska i Italija (Dimić, 2005.). Plodovi lješnjaka sakupljaju se ručno i sadrže ljusku koja se potom mehanički uklanja, te se može koristiti kao sirovina za proizvodnju drvenog ugljena (Dimić, 2005.). Plodovi lješnjaka su popularni orašasti plodovi koji se na tržištu nalaze kao očišćeni ili s ljuskom, te prerađeni u ulje, brašno, mlijeko i maslac. Izvor su nezasićenih masnih kiselina od kojih su najzastupljenije oleinska (80%) i linolna (6-12%), koje pozitivno utječu na ljudski organizam (Jokić i sur., 2016.). Osnovni kemijski sastav plodova lješnjaka prikazan je u **Tablici 4**. Također, plodovi lješnjaka dobar su izvor proteina, vitamina, minerala i drugih komponenti (arginin, β -sitosterol, vitamin B6, E i A, željezo, bakar, magnezij, selen i itd.) (Wetherilt i Pala, 1998.).

Tablica 4 Osnovni kemijski sastav ploda lješnjaka (Jokić i sur., 2016.)

Komponenta	Udio (%)
Ulje	65
Proteini	14
Ugljikohidrati	16

2.2.1.1. Lješnjakovo ulje

Lješnjakovo ulje je ugodnog mirisa i ima „slatkasti“ okus, te je zlatnožute boje. Upotrebljava se u kulinarstvu, te u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Karleskind, 1996.; Vaughan, 1977.). Lješnjakovo ulje sadrži visok udio tokoferola, odnosno vitamina E zbog čega posjeduje visoku antioksidacijsku stabilnost. Upravo vitamin E prilikom konzumacije ulja ima ulogu kao „zaštitni faktor“ u oksidacijskim procesima koji se odvijaju u organizmu (Wetherilt i Pala, 1998.). Lješnjakovo ulje zbog svog nutritivnog sastava ima pozitivan utjecaj na zdravlje i svojstvenu primamljivu aromu, pa je porasla zainteresiranost za njegovu konzumaciju zbog promjena prehrambenih navika potrošača koji su orijentirani prema zdravom načinu života (Yilmaz i Öğütçü, 2014.).

Zemlje koje su veliki proizvođači lješnjaka, ulje lješnjaka koristi se kao rafinirano u kulinarstvu. Druge zemlje koje uvoze lješnjak, ulje lješnjaka koriste većinom kao začinsko koje je nerafinirano jestivo ulje (Dimić, 2005.).

Prema sastavu masnih kiselina lješnjakovog ulja vidljiva je prisutnost zasićenih masnih kiselina (8 - 9 %) i mononezasićenih masnih kiselina (oko 75 %). Zbog svog sastava masnih kiselina (**Tablica 5**) lješnjakovo ulje svrstava se u grupu „oleinskog“ tipa ulja (Karleskind, 1996.).

Tablica 5 Sastav masnih kiselina koje se nalaze u lješnjakovom ulju (Dimić, 2005.)

Masna kiselina	Wetherilt i Pala, 1998.	Karleskind, 1996.	Maguire i sur., 2014.	Zlatanov i Antova, 1998.
Palmitinska C16:0	5,9 – 7,4	5 - 9	5,82	8,6
Stearinska C18:0	2,1 – 3,6	1 – 4	2,74	1,8
Oleinska C18:1	72,3 – 80	66 – 83	79,30	83,2
Linolna C18:2	9,8 – 17,7	8 – 25	10,39	1,5

Prema istraživanjima na temu funkcionalnog sastava lipida lješnjaka (*Corylus avellana* L.) Alasalvar i sur. su 2006. godine ustanovili su da lješnjakovo ulje u svome sastavu sadrži sljedećih glavne izomerne oblike triglicerida: OOO (71,31 %), OOL (12,26 %) i POO (9,54 %).

2.2.2. Koštice grožđa

Plod vinove loze je grožđe *Vitis vinifera* L. koje se uzgaja kao voćarska kultura širom svijeta, te se koristi u tehnologiji proizvodnje vina. U tehnologiji vina prilikom procesa prerade grožđa nastaje nusprodukt proizvodnje tj. komina koja se u razvijenim zemljama koristi za proizvodnju:

- ulja iz koštica (sjemenki) grožđa i
- biološki aktivnih komponenti iz ljuske (Dimić, 2005.).

Komina koja nastaje kao nusprodukt proizvodnje vina obično sadrži 14 – 30 % sjemenki grožđa, te ostale komponente kao što su dijelovi stabljike u udjelu 8 – 10 % dok ostatak udjela čine kožice prešanog grožđa (Schieber i sur., 2002.). Koštice grožđa imaju 10 – 20 % ulja pri čemu je udio vitamina E visok zbog čega ulje koštica grožđa ima antioksidacijsko djelovanje i pozitivan učinak na ljudsko zdravlje (Schuster, 1992.). Prikaz sastava koštica grožđa vidljiv je u **Tablici 6.**

Tablica 6 Prikaz sastava koštica grožđa (Domokos i Kiss, 2002.)

Sastojak	Udio u vlažnom sjemenu (%)	Udio u suhom sjemenu (%)
Voda	30 – 52	-
Ulje	8 – 12	12 – 22
Pepeo	1,2 – 2,0	-
Sirovi proteini	-	12
Sirova vlakna od toga celuloza	-	46 – 48 10 – 12
Polisaharidi	-	8 – 10
Tanini	-	5,7
Lecitin	-	0,12
Fitin	-	0,72

2.2.2.1. Ulje koštica grožđa

Ulje koštica grožđa okusom podsjeća na orahe, te je boje koja se kreće od zelenkaste do zlatno-žute, dok pri dužem stajanju ulje može poprimiti i smeđu boju. Ulje koštica grožđa dobije se prešanjem koštica grožđa u pužnim ili hidrauličkim prešama, ali zbog malog udjela ulja u

košticama grožđa primjena ekstrakcije je metoda koja je efikasnija za izdvajanje ulja (Dimić, 2005.).

Bitno je obratiti pažnju na čuvanje i skladištenje koštica grožđa prije njihove prerade u ulje. Važno je čuvati suhe i čiste koštice grožđa kako ne bi došlo do mikrobiološkog procesa kvarenja, gdje se sadržaj ulja u košticama smanjuje i povećava se kiselost ulja (Dimić, 2005.). U **Tablici 7** su prikazane fizikalno – kemijske karakteristike ulja koštica grožđa koje se koristi kao jestivo ulje, te udio pojedinih masnih kiselina.

Osim u kulinarstvu ulje koštica koristi se u kozmetičkoj industriji gdje ulazi u sastav mnogih sredstava za njegu poput onih za kosu, kožu, usta, te krema za ruke (Domokos i Kiss, 2002.).

Tablica 7 Prikaz fizikalno-kemijskih karakteristika i sastava masnih kiselina koštica grožđa

Pokazatelj	Hussein i Adbrabba, 2015.	Karleskind, 1996.	Domokos i Kiss, 2002.
Specifična težina 20 °C (kg/dm ³)	0,8965	0,908 – 0,911	0,924 – 0,937
Ind. refrakcije (n ²⁰ _D) (n ⁴⁰ _D)	1,4731 -	1,473 – 1,476 -	1,471 – 1,486 -
Viakozitet (cP); 20 °C	-	53-58	-
Jodni broj (g/100g)	165,5	130 – 138	121 – 157
Saponifikacijski broj (mg KOH/g)	192,21	188 – 194	181 – 206
Točka očvršćivanja (°C)	-	od – 11 do – 17	od – 10 do – 24
Sastav masnih kiselina (% m/m)	Sabir i sur., 2012.	Karleskind, 1996.	Domokos i Kiss, 2002.
Palmitinska C 16:0	6,9 – 12,9	7 – 10	5,9 – 7,5
Stearinska C 18:0	1,44 – 4,69	3 – 6	2,4 – 4,0
Oleinska C 18:1	16,2 – 31,2	14 – 22	15 – 20
Linolna C 18:2	53,3 – 70,4	65 – 73	69 – 78

Ulje koštica grožđa u sastavu ima trigliceride sljedećih glavnih izomernih oblika u udjelima od: 35,7 % LLL, 21 % OLL, 17 % PLL i 10,3 % LOO (Karleskind, 1996.).

2.3. VRSTE KVARENJA BILJNIH ULJA

Biljna ulja su zbog svog sastava podložna kvarenju uslijed kojega se narušava njihova kvaliteta, tada ulja postaju neprihvatljiva za prehranu. Promjene do kojih dolazi uslijed složenih

biokemijskih i kemijskih reakcija dovode do stvaranja hlapljivih spojeva koji mijenjaju okus, boju i miris ulja, što rezultira kvarenjem biljnih ulja (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Procesi koji se odvijaju prilikom kvarenja ulja mogu se podijeliti na:

- enzimске i mikrobiološke procese i
- kemijske procese (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.).

Također prilikom kvarenja ulja mijenja se i prehrambena vrijednost biljnog ulja, te dolazi do gubitka biološki aktivnih tvari poput esencijalnih masnih kiselina, provitamina, vitamina i dr. sastojaka (Volmut, 2010.). Osim gubitka prethodno nabrojanih sastojaka nastaju i štetne tvari (peroksidi i polimeri) koji ubrzavaju kvarenje ulja i na taj način dodatno skraćuju trajnost ulja.

2.3.1. Mikrobiološki i enzimski procesi kvarenja

Mikrobiološki i enzimski procesi kvarenja odvijaju se uz prisutnost mikroorganizama ili enzima koji uz odgovarajuće uvjete rasta i sredinu (a_w , pH, temperatura i dr.) dovode do kvarenje ulja (Volmut, 2010.). Kvarenje ovog tipa vezano je uz uvjete skladištenja sjemena i plodovima uljarica, stoga je bitno voditi brigu o svim uvjetima i parametrima prilikom skladištenja kako bi se ono svelo na minimum (Rade i sur., 2001.).

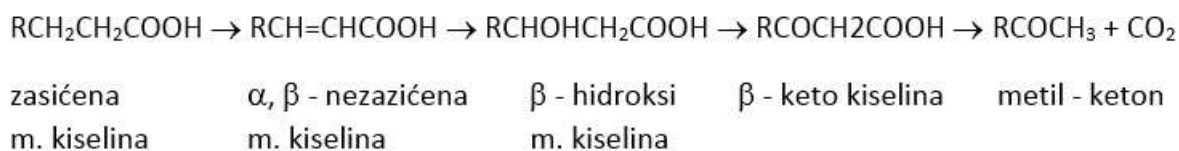
Mikrobiološki i enzimski procesi kvarenja dijele se na:

- β - ketooksidaciju i
- Hidrolitičku razgradnju.

β - ketooksidacija

β - ketooksidacija je proces oksidacije (**Slika 1**) koji nastaje uz djelovanje mikroorganizama tj. gljivica koje pripadaju grupama *Aspergillus* i *Penicillium*, te bakterijama *Bacillus mesentericus* i *Bacillus subtilis* (Volmut, 2010.). Produkti koji nastaju djelovanjem navedenih mikroorganizama mogu biti primarni produkti (β - keto kiselina) i sekundarni produkti (metil

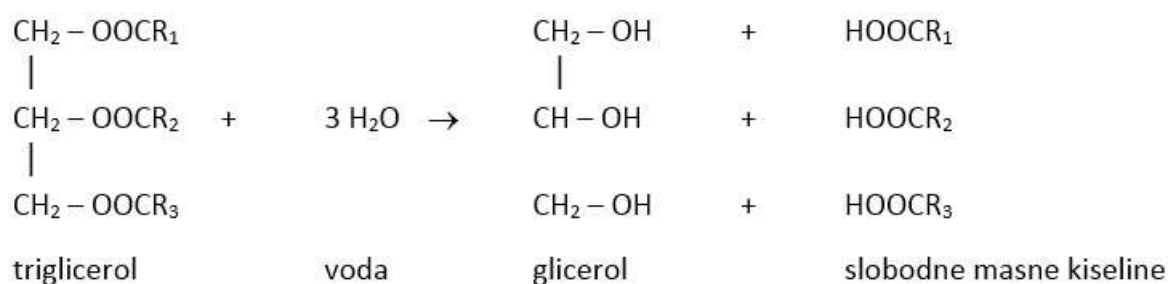
ketoni). Navedeni produkti dovode do procesa oksidacije ulja i masti koje tada poprimaju „užegao“ miris i okus.



Slika 1 Prikaz reakcije β - ketooksidacije

Hidrolitička razgradnja

Hidrolitička razgradnja je proces gdje lipolitički enzimi tj. lipaze dovode do hidrolize triglicerida uz prisutnost vode i povišene temperature, uslijed čega nastaju slobodne masne kiseline (SMK). Osim SMK produkti ovih reakcija hidrolize su i monogliceridi, digliceridi, te glicerol koji dovode do povećanja kiselosti ulja. Proces hidrolitičke razgradnje prikazan je na **Slici 2**.



Slika 2 Prikaz reakcije hidrolitičke razgradnje ulja

2.3.2. Kemijski procesi kvarenja

Biljna ulja podliježu kemijskim procesima kvarenja kao što su:

- Autooksidacija,
- Termooksidacijske promjene i
- Reverzija.

Autooksidacija

Autooksidacija je proces u kojemu kisik iz zraka djeluje na dvostruke veze nezasićenog lanca masne kiseline, pri čemu nastaju slobodni radikali koji dovode do oksidacijskog lančanog procesa.

U proces autooksidacije uključene su tri faze:

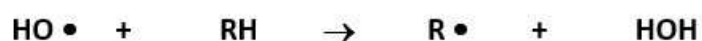
1. Inicijacija – početak reakcije
2. Propagacija – tijek reakcije
3. Terminacija – završetak reakcije

Ovisno o sastavu ulja, uvjetima skladištenja i prisutnosti sastojaka koji ubrzavaju ili usporavaju autooksidaciju navedeni proces autooksidacije može se odvijati ubrzano ili usporeno. Jednom započeti proces autooksidacije nije moguće zaustaviti. Ovo kvarenje ulja dovodi do užeglosti ulja, te je ono ujedno i najčešće kvarenje ulja. Početak reakcije ili faza inicijacije je proces homolitičkog cijepanja gdje uz djelovanje topline, energije ultraljubičastog ili vidljivog svjetla, te uz djelovanje iona metala dolazi do stvaranja alkil radikala masne kiseline i izdvajanja vodika (Volmut, 2010.). Nakon toga tijek reakcije se nastavlja, te u drugoj fazi propagacije dolazi do nastanka radikala hidroperoksida i peroksida tj. primarnih produkata oksidacije. Sekundarni produkti razgradnje hidroperoksida (aldehidi, ketoni, alkoholi, kiseline i dr. spojevi) nastaju u manjim količinama, ali dovode do pojave neugodnog mirisa i okusa ulja. Hidroperoksidi su katalizatori reakcije autooksidacije koji ubrzavaju daljnji tijek reakcije. Zadnja faza autooksidacije je završetak reakcije ili terminacije gdje dolazi do međusobne reakcije

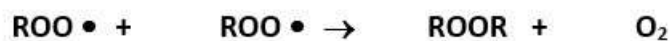
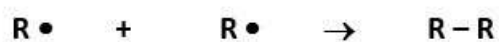
slobodnih radikala prilikom čega nastaju polimeri ($R - R$, $ROOR$) koji su inaktivni, te se reakcije autooksidacije završavaju. Na **Slici 3** prikazane su faze autooksidacije ulja.



1. Faza inicijacije



2. Faza propagacije



3. Faza terminacije

RH – masne kiseline,

$R \bullet$, $RO \bullet$ – slobodni radikali,

$ROO \bullet$ – radikal peroksida,

$ROOH$ – hidroperoksid,

$HOO \bullet$ – radikal vodikovog peroksida,

$R - R$, $ROOR$ – polimeri.

Slika 3 Prikaz reakcije autooksidacije ulja

Termooksidacijske promjene

Termooksidacijske promjene nastaju složenim kemijskim reakcijama gdje zagrijavanjem ulja pri visokim temperaturama (iznad 150 °C) , uz prisutnost zraka i vodene pare nastaju termooksidacijski produkti. Cikličke masne kiseline, dimeri i polimeri masnih kiselina, trigliceridi, oksipolimeri, te drugi hlapljivi i nehlapljivi spojevi su neki od spojeva koji nastaju prilikom ovih reakcija (Vidyasagar i sur., 1974.). Termooksidacijske promjene koje se odvijaju ovise o: vrsti ulja, temperaturi i dužini zagrijavanja. Ulja koja u svome sastavu sadrže veći udio nezasićenih masnih kiselina npr. suncokretovo ulje (udio linolne kiseline je 60 - 70 %) podložnija su termooksidacijskim promjenama, te produkti reakcija nastaju puno brže u usporedbi s uljima koja sadrže manji udio nezasićenih masnih kiselina. Udio polinezasićenih masnih kiselina koje su ujedno i esencijalne masne kiseline prilikom termičke obrade hrane tj. prženja hrane se smanjuje, čime dolazi do promjene nutritivnog sastava ulja (Volmut, 2010.).

Reverzija

Reverzija je pojava koja dovodi do promjene mirisa i okusa kod pojedinih biljnih ulja. Prilikom zagrijavanja nekih biljnih ulja dolazi do neugodnog mirisa i okusa na ribu koji je izraženiji kada se ulje zagrijava (Rac, 1964.). Reverzija mirisa i okusa prisutna je kod biljnih ulja koja sadrže linolensku kiselinu koja oksidira za vrijeme procesa autooksidacije. Upravo zbog toga primjenjuje se djelomična hidrogenacija ili dodatak aditiva uljima u cilju usporavanja reverzije i povećanja održivosti ulja (Oštirć-Matiješević i Turkulov, 1980.).

2.4. STABILIZACIJA BILJNIH ULJA

Prilikom skladištenja biljnih ulja važno je poznavati oksidacijsku stabilnost ulja, koja predstavlja vrijeme kroz koje se biljno ulje može sačuvati od autooksidacije. Zbog oksidacijskog kvarenja dolazi do degradacijskih promjena koje narušavaju nutritivni sastav ulja, te dolazi do nepovoljnih senzorskih promjena ulja. Sljedeći čimbenici poput sastava i rasporeda masnih kiselina u molekuli triglicerida, te različite komponente koje su prisutne u uljima imaju utjecaj

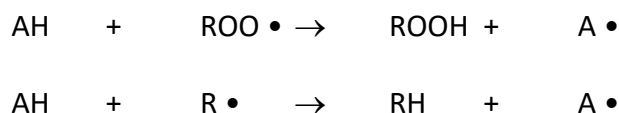
na oksidacijsku stabilnost ulja (Shahidi i Zhong, 2005.). Antioksidansi su tvari koje se dodaju uljima kako bi se produžila trajnost i održivost ulja.

2.4.1. Antioksidansi

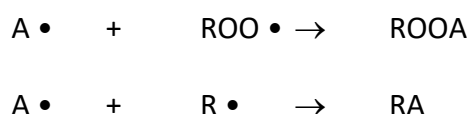
Antioksidansi su tvari koje sprječavaju tj. usporavaju oksidacijsko kvarenje ulja i na taj način produžuju oksidacijsku stabilnost i rok trajanja biljnog ulja. Antioksidansi koji se koriste za stabilizaciju biljnih ulja mogu biti prirodni i sintetski (Berra i sur., 2006.). Male količine antioksidansa ulje štite od oksidacijskog kvarenja, dok stupanj djelovanja antioksidansa ovisi o sljedećim čimbenicima: temperatura, koncentracija antioksidansa, prisutnosti drugih antioksidansa i pojedinih sastojaka hrane (Pokorny i sur., 2001.).

Mehanizam djelovanja antioksidansa odvija se u dvije reakcije:

Prva reakcija je vezanje antioksidansa (AH), gdje antioksidans daje vodik (H), koji se potom veže na slobodni radikal peroksida ($\text{ROO} \bullet$) ili na slobodni radikal masne kiseline ($\text{R} \bullet$).



U drugoj reakciji na slobodni radikal ($\text{ROO} \bullet$ ili $\text{R} \bullet$) veže se slobodni radikal antioksidansa ($\text{A} \bullet$).



Ove dvije reakcije prekidaju reakciju oksidacije, te na taj način produžuju održivost ulja kroz određeni vremenski period. Djelovanje antioksidansa u biljnim uljima ovisi o njegovoj dodanoj količini koja je zakonski propisana, što znači da antioksidans djeluje sve dok se ne potroši.

Vrijeme djelovanja antioksidansa ovisi o: vrsti antioksidansa, dodanoj koncentraciji antioksidansa, vrsti ulja, sastavu masti, te uvjetima čuvanja ulja. Neki od najzastupljenijih prirodnih i sintetskih antioksidanasa u hrani prikazani su **Tablici 8**.

Tablica 8 Najzastupljeniji prirodni i sintetski antioksidansi u hrani (Shahidi i Zhong, 2005.)

Prirodni antioksidansi	Sintetski antioksidansi
Karotenoidi	Butilhidrokisanisol (BHA)
Flavonoidi	Butilhidroksitoulén (BHT)
Fenolne kiseline	Etoksiquin (EQ)
Tokoferoli i tokotrienoli	Propil galat (PG) Tercijarni butilhidrokinon (TBHQ)

Stabilizacijski (zaštitni) faktor (PF) se definira kao omjer indukcijskog perioda ulja sa dodatkom i ulja bez dodatka antioksidansa, te pokazuje antioksidacijsko djelovanje antioksidansa kroz povećanje održivosti ulja (Bandoniene i sur., 2000.).

$$\text{Zaštitni faktor (PF)} = \text{IP}_x - \text{IP}_k$$

IP_x – indukcijski period ulja sa dodatkom antioksidansa (h)

IP_k – indukcijski period ulja bez dodatka antioksidansa (h)

Prirodni antioksidansi

U posljednje vrijeme prirodni antioksidansi sve se više dodaju u hranu jer su prirodni sastojci puno sigurniji i bolji za korištenje prilikom proizvodnje hrane. Prirodni antioksidansi mogu se naći u raznim dijelovima biljaka kao što su: korijen, kora, sjemenke i lišće (Berra i sur., 2006.). Kao izvori prirodnih antioksidansa navode se: začini i začinsko bilje, žitarice, kakao ljuska, eterična ulja, ekstrakti biljaka, voće i povrće itd. (Yanishlieva i Marinova, 2001.). Prethodno navedeni izvori prirodnih antioksidanasa sadrže spojeve poput: tokoferola, flavonoida, fenolnih kiselina, karotenoida i askorbinske kiseline. Ekstrakti biljaka koji se koriste kao začini (ružmarin, timijan, kadulja, origano i dr.) sadrže komponente koje imaju antioksidacijsko djelovanje. Kroz istraživanja utvrđeno je antioksidacijsko djelovanje lišća i ekstrakta biljaka kadulje i ružmarina (Pokorny i sur., 1997.). Antioksidacijsko djelovanje ružmarina pripisuje se njegovim aktivnim komponentama kao što su: karnosol, rozamol, karnosolna te ursolična

kiselina (Özcan i Arslan, 2011.). Kadulja također sadrži komponente (terpeni i polifenoli) koje posjeduju antioksidacijsko djelovanje.

Sintetski antioksidansi

Ulja i masti, te hrana koja sadrži lipide može se stabilizirati sintetskim (umjetnim) antioksidansima (Volmut, 2010.). Sintetski antioksidansi pripadaju skupini aditiva jer nisu prirodni sastojak hrane, već su dobiveni kemijskim putem zbog čega je njihova količina u hrani regulirana Pravilnikom o prehrambenim aditivima NN 62/2010 (MZSS, 2010.). Sintetski antioksidansi sadrže fenolnu aktivnu skupinu. Najčešće se koriste butilhidroksianisol (BHA), butilhidroksitoulén (BHT) i tercijarni butilhidrokinon (TBHQ) što je prikazano u **Tablici 8**. Kroz istraživanja uočeno je da se upravo ovi antioksidansi povezuju s štetnim i toksičnim djelovanjem na ljudski organizam. Upravo zbog toga zalaže se korištenje prirodnih sastojaka iz jestivih biljaka koje su izvor prirodnih antioksidansa (Özcan i Arslan, 2011.). Dozvoljena koncentracija BHA u uljima je maksimalno do 0,02%, dok ostali antioksidansi imaju dozvoljenu maksimalnu koncentraciju do 0,01%. Antioksidansi međusobno mogu imati sinergistički učinak, zbog toga bolje je uljima dodavati smjesu antioksidansa kako bi se postigla bolja održivost ulja.

2.4.2. Sinergisti

Sinergisti imaju ulogu da produžuju djelovanje antioksidansa, dok sami kao kemijski spojevi nemaju antioksidacijsko djelovanje. Uz antioksidanse najčešće se koriste sljedeći sinergisti: limunska, askorbinska i octena kiselina, monoizopropil citrat, askorbil palmitat i lecitin. Uz antioksidans se obično dodaje od 0,005% do 0,02% sinergista što je zakonski propisano. Antioksidansi imaju bolje sinergističko djelovanje s određenim sinergistima. Tokoferoli najbolje djeluju uz sljedeće sinergiste poput: askorbinska kiselina, askobil palmitat i limunska kiselina. Sinergisti se dodaju uljima u procesu dezodorizacije pri kraju samog procesa.

Djelovanje sinergista može se opisati kroz sljedeća tri mehanizma djelovanja:

1. Sprječavaju prooksidacijsko djelovanje iona metala na način da se vežu na ione metala, te ih tako inaktiviraju;
2. Atom vodika daju radikalu antioksidansa, pri čemu ga regeneriraju i produžuju vrijeme trajanja antioksidansa;
3. Vežu se sa radikalom antioksidansa i zaustavljaju njegov utjecaj na razgradnju peroksida (Koprivnjak, 2006.).

2.4.3. Prooksidansi

Proces autooksidacije ulja odvija se postepeno i ne može se spriječiti, ali moguće je usporiti ovaj proces eliminacijom slijedećih čimbenika: temperatura, svjetlost, tragovi metala i pojedini pigmenti koji su najčešći prooksidansi. Prooksidansi mogu biti i slobodne masne kiseline, zbog karboksilne skupine koja ubrzava razgradnju hidroperoksida (Miyashita i Takagi, 1986.).

Temperatura

Djelovanje kisika iz zraka na nezasićene masne kiseline se ubrzava povišenjem temperature što ubrzava autooksidaciju ulja (Vrbeški, 1972.). Oksidacijsko kvarenje ulja nije moguće spriječiti, ono se polako odvija i pri temperaturama nižim od – 20 °C. Djelovanje povišene temperature izraženije je kod ulja s većim udjelom polinezasićenih masnih kiselina. Bitno je voditi brigu o temperaturama na kojima se skladišti ulje.

Svjetlost

Svjetlost ima direktan utjecaj na autooksidaciju ulja. Oksidacija, autooksidacija i razgradnja peroksida ulja ubrzana je prilikom utjecaja kraćih valnih duljina svjetlosti (manje od 380 nm) (Volmut, 2010.). Kako bi se smanjio negativan utjecaj svjetlosti na održivost ulja bitno je ulje skladištiti i čuvati u ambalaži koja onemogućuje utjecaj svjetlosti i kisika iz zraka. Ulja se zbog toga pakiraju u tamnu ambalažu.

Tragovi metala

U ulju se nalazi male količine iona metala koje djeluju kao prooksidasni. Tragovi iona metala djeluju kao prooksidansi samo u slučaju kada su u ulju već prisutni i hidroperoksidi (Volmut, 2010.). Metali djeluju na hidroperoksidi pri čemu dolazi do oksidacije iona metala i stvaranja slobodnog radikala. Prooksidacijsko djelovanje metala može se definirati ovim redom: $\text{Cu} > \text{Mn} > \text{Fe} > \text{Cr} > \text{Ni} > \text{Zn} > \text{Al}$ (Volmut, 2010.).

Pigmenti

Klorofil i hem-spojevi imaju prooksidacijsko djelovanje na ulje. Uz prisustvo svjetlosti klorofil djeluje kao prooksidans kroz proces fotokemijske oksidacije. Proizvodi od mesa i koncentratu juha neki su od proizvoda u kojima su hem-spojevi sastavni dijelovi, zbog toga se prilikom proizvodnje ovih proizvoda treba koristiti svježije ulje (Volmut, 2010.).

2.5. METODE ODREĐIVANJA STUPNJA OKSIDACIJE ULJA

Određivanje stupnja oksidacije ulja prati se kroz niz metoda, pri čemu niti jedna samostalno nije dovoljna za pravilnu procjenu rezultata. Upravo zbog toga se primjenjuje više metoda (**Tablica 9**) za pregled ukupnog sadržaja stupnja nastalih oksidacijskih promjena (Crapiste i sur., 1999.).

Stupanj oksidacije ulja može se pratiti kroz sljedeće tri grupe metoda:

1. Senzorske metode,
2. Kemijske metode i
3. Fizikalne metode.

2.5.1. Senzorske metode

Senzorske metode temelje se na određivanju boje, okusa i mirisa ulja. Ukoliko je došlo do oksidacije ulje će poprimiti neprijatan miris i okus, zbog nastalih sekundarnih produkata oksidacije (ketoni i aldehidi). Organoleptičko ocjenjivanje ulja uz ostale kemijske i fizikalne metode važno je zbog ispitivanja kvalitete ulja.

2.5.2. Kemijske metode

Kemijske metode pripadaju u analitičke metode za procjenu oksidacije ulja. Kemijske metode koje se koriste za određivanje navedenih parametara za ocjenjivanje stupnja oksidacije ulja i masti prikazane su u **Tablici 9**.

Tablica 9 Prikaz analitičkih metoda za procjenu stupnja oksidacije ulja i masti (Dimić i Turkulov, 2000.)

Analitička metoda	Ispitivani parametar
Kemijske metode	
Peroksidni broj (Pbr)	Peroksidi
TBK test (broj)	Malonaldehid
Karbonilni broj	Svi spojevi s karbonilnom skupinom
Anisidinski broj (Abr)	Nehlapljivi karbonilni spojevi
Kreis – ov test	Epoksialdehidi i acetali
Oksidacijska vrijednost (OV) ili Totox broj	$OV = 2PV + AV$, ukupni sadržaj primarnih i sekundarnih produkata oksidacije
Fizikalne metode	
UV spektrofotometrija	Konjugirani dieni i trieni
IR spektrofotometrija	Primarni i sekundarni produkti oksidacije
NMR (nuklearna magnetska rezonancija)	Hidroperoksidi i alkoholi
Fluorescencija	Karbonilni spojevi (malonaldehid) i ketoni
Plinska kromatografija	Hlapljivi spojevi
HPLC	Malonaldehid i sekundarni proizvodi
Indeks refrakcije	Primarni i sekundarni produkti oksidacije
Dielektrična konstanta	Primarni i sekundarni produkti oksidacije
Polarografija	Hidroperoksidi
Kulonometrija	Hidroperoksidi
Kromatografija u koloni	Polimeri, polarni spojevi

Peroksidni broj (Pbr)

Peroksidni broj prikazuje stupanj oksidacije masnih kiselina i nastanak određene količine primarnih produkata oksidacije. Peroksidni broj se prikazuje u miliekvivalentima O_2 ili mmol

O₂/kg ulja (Dimić i Turkulov, 2000.). Metoda određivanja pripada jodometrijskim metodama koje se zasnivaju na titrimetrijskom određivanju joda, koji je oslobođen iz kalij-jodida pomoću peroksida. Prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima (NN 11/2019) za hladno prešana i djevičanska ulja max. vrijednost Pbr je 7 mmol O₂/kg, dok za rafinirana biljna ulja je max. 5 mmol O₂/kg.

Tiobarbiturni broj (Tbr)

Tiobarbiturni broj prikazuje oksidacijske promjene na temelju količine nastalih sekundarnih produkata oksidacije ulja. Metoda pripada kolorimetrijskim metodama, gdje se mjeri intenzitet ružičaste boje na 532 nm koja nastaje kao rezultat reakcije tiobarbiturne kiseline sa malonaldehidom.

Anisidinski broj (Abr)

Anisidinski broj prikazuje udio sekundarnih produkata oksidacije ulja koji nastaju u reakciji viših nezasićenih aldehyda sa p-anisidinom u kiselom mediju (Dimić i Turkulov, 2000.). Nastali nehlapljivi karbonilni spojevi prikazuju da je ulje bilo izloženo većoj oksidaciji (Rade i sur., 2001; Dimić i Turkulov, 2000.). Prilikom procjene kvalitete ulja i ispitivanja ulja važno je određivanje anisidinskog broja (Crapiste i sur., 1999.; List i sur., 1974.).

Totox broj (TB) ili oksidacijska vrijednost ulja (OV)

Totox broj ili oksidacijska vrijednost ulja dobije se tako da se zbroje dobivene vrijednosti peroksidnog i anisidinskog broja kao što je prikazano u formuli:

$$TB = 2 \text{ Pbr} + \text{Abr}$$

2.5.3. Fizikalne metode

Fizikalne metode pripadaju analitičkim metodama pomoću kojih se procjenjuje oksidacijsko kvarenje ulja. U **Tablici 9** prikazane su fizikalne metode i parametri koji se koriste za ocjenjivanje stupnja oksidacije ulja i masti.

UV-spektrofotometrija

Prilikom razgradnje polinezasićenih masnih kiselina nastaju primarni produkti oksidacije koji u ultraljubičastom području pokazuju specifičan spektar. Vrijednost apsorbancije se očitava na 232 i 270 nm u UV području jer tada navedeni produkti pokazuju apsorpcijski maksimum. R-vrijednost je omjer ove dvije apsorbancije, koja ujedno služi kao podatak za procjenu kvalitete ulja (Volmut, 2010.).

$$R\text{-vrijednost} = A_{232 \text{ nm}}/A_{270 \text{ nm}}$$

$A_{232 \text{ nm}}$ – apsorbancija na 232 nm

$A_{270 \text{ nm}}$ – apsorbancija na 270 nm

Plinska kromatografija

Metoda plinske kromatografije se koristi za određivanje oksidacijskih promjena na nezasićenim masnim kiselinama. Plinska kromatografija se uspješnije provodi kod čistih ulja i masti, dok je praćenje kompleksnih lipinih sustava pomoću ove metode otežano. Pomoću ove metode određuju se hlapljivi spojevi (ketoni i aldehidi) koji nastaju kao produkti razgradnje u procesu oksidacije ulja i masti (Rade i sur., 2001.).

Indeks refrakcije

Produkti kao što su konjugirani dieni hidroperoksida i polimeri koji nastaju u procesu oksidacije ulja i masti mogu se pratiti kroz promjenu indeksa refrakcije jer se u tom slučaju indeks refrakcije povećava (Rade i sur., 2001.).

2.6. OKSIDACIJSKA STABILNOST ULJA

Ulja i masti zbog svog sastava podložna su kvarenju što utječe na rok trajanja. Kako bi unaprijed mogli odrediti vremenski period u kojemu neće doći do negativnih promjena okusa,

mirisa i boje ulja, bitno je poznavati oksidacijsku stabilnost ili održivost ulja. Oksidacijska stabilnost ili održivost ulja predstavlja ono vrijeme kroz koje se ulja i masti mogu sačuvati od autooksidacije. Potrebno je poznavanje održivosti ulja kako bi se utvrdilo vrijeme kroz koje se ulje može čuvati, a da pri tome ne dođe do promjene njegove kvalitete. Ubrzana oksidacija ulja uz utjecaj nekih od čimbenika koji ubrzavaju kvarenje ulja, princip je na kojem se temelje metode koje se koriste za određivanje održivosti ulja (Dimić, 2005.). Vrijeme u satima ili danima koje je potrebno da uzorak ulja dostigne određenu vrijednost peroksidnog broja, prikazuje održivost ulja. Metode koje se koriste za određivanje održivosti ulja prikazane su u **Tablici 10.**

Tablica 10 Prikaz analitičkih metoda za određivanje oksidacijske stabilnosti ulja (Dimić i Turkulov, 2000.)

Analitička metoda	Ispitivani parametar
Oven test (Schall Oven test)	Peroksidi, promjene senzorskih svojstava (miris i okus)
AOM test (Active Oxygen method) ili Swift test	Peroksidi
Rancimat test	Niže molekularne kiseline, provodljivost
Metode apsorpcije kisika	Apsorbirani kisik
Test na bazi fluorescentnog svjetla	Peroksidi, senzorske promjene

Danas u praksi najviše se primjenjuju: Oven test, Swift test i Rancimat test.

2.6.1. Oven test (Schaal Oven test)

Oven test za ispitivanje održivosti ulja i masti je metoda koja je najjednostavnija zbog čega je upravo ona jedna od najstarijih metoda koja se već duže vrijeme koristi. Oven test se provodi na način da se uzorci ulja zagrijevaju u termostatu (ili sušioniku) na temperaturi 60 – 63 °C. Tokom provođenja testa prati se porast peroksidnog broja ili senzorske promjene u točno određenim vremenskim intervalima. Dobiveni rezultati Oven testa prikazuju se kao:

- vrijednost peroksidnog broja nakon određenog vremenskog intervala (dana) prilikom kojega su uzroci bili izloženi temperaturi od 63 °C (za jestiva ulja test se provodi kroz 4 dana pri temperaturi od 63 °C),
- broj dana kroz koje se postiže već unaprijed utvrđena vrijednost peroksidnog broja,
- vrijeme (u danima) kada se utvrdi užeglost senzorskim ispitivanjem uzorka.

Oven testom utvrđeno je da jedan dan provedenog Oven testa odgovara stvarnoj održivosti ulja kroz 6 – 12 dana na sobnoj temperaturi (oko 20 °C) (Dimić i Turkulov, 2000.).

2.6.2. AOM test (Active oxygen method) ili Swift test

Swift test se provodi u Swift uređaju gdje kroz uzroke ulja prolazi struja zraka uz zagrijavanje na temperaturu od 98 °C. Peroksidni broj se određuje u točnim vremenskim intervalima nakon uzimanja uzorka ulja. Određivanje peroksidnog broja provodi se do vrijednosti od 5 mmol O₂/kg koja je granica pri kojoj je ulje još uvijek ispravno. Nakon 8 sati Swift metode kvalitetna biljna ulja trebala bi imati vrijednost peroksidnog broja manju od 5 mmol O₂/kg (Rade i sur., 2001.).

2.6.3. Rancimat test

Rancimat test je ubrzana instrumentalna metoda (ISO metoda) koja se provodi za oksidaciju ulja i masti (Volmut, 2010.). Rancimat test se provodi u Rancimat uređaju gdje se oksidacija uzoraka ulja odvija uz konstantan dovod zraka i povišenu temperaturu (100 °C, 110 °C, 120 °C). Vršiti se određivanje koncentracije kratkolančanih hlapljivih organskih kiselina koje se uvode u deioniziranu vodu. Tijekom oksidacije ulja prati se indirektno, mjerenjem porasta vodljivosti prilikom uvođenja nastalih kiselina iz posude sa uzrokom u demineraliziranu vodu (Dimić, 2005.). Indukcijski period koji se prikazuje u satima pri određenoj temperaturi i protoku zraka pokazuje indeks održivosti ulja (Rade i sur., 2001.). Ako ulje ima veću vrijednost IP (h) takvo ulje je otpornije prema oksidacijskom kvarenju.

2.6.4. Test održivosti na 98 °C

Metoda se provodi u sušioniku na temperaturi od 98 °C, uzorci ulja koji se ispituju svakih sat vremena se izvade, te se uzima uzorak za određivanje peroksidnog broja. Ovim testom utvrđeno je da jedan sat provedenog testa prikazuje stvarnu održivost ulja kroz 10 – 15 dana na sobnoj temperaturi od 20 °C. Dobiveni rezultati pokazuju dobru korelaciju između rezultata koji se dobiju AOM testom i Oven testom. Prilikom izvođenja testa održivosti na 98 °C zbog neodgovarajućih uvjeta proces autooksidacije javlja se nedostatak jer se na višim temperaturama procesa oksidacije ulja ne odvija isto kao i na sobnoj temperaturi. Rezultati testa održivosti na 98 °C pokazuju mogućnost za približno određivanje oksidacijske stabilnosti ulja na sobnoj temperaturi (Moslavac, 2013.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je ispitati utjecaj dodatka antioksidanasa (prirodni i sintetski) na oksidacijsku stabilnost mješavine hladno prešanog lješnjakovog ulja (70 %) i hladno prešanog ulja koštica grožđa (30 %) pomoću Oven testa koji se temelji na ubrzanoj oksidaciji ulja na temperaturi od 63 °C.

Kako bi se pratio utjecaj dodatka antioksidansa na održivost ove mješavine ulja potrebno je provesti sljedeće:

1. Određivanje osnovnih parametara kvalitete pojedinog ulja koja se ispituju (slobodne masne kiseline i peroksidni broj);
2. Određivanje održivosti mješavine ulja lješnjaka i ulja koštica grožđa (70:30);
3. Ispitivanje utjecaja dodatka prirodnih antioksidanasa: ekstrakt kadulje (1:10, 65% EtOH – UZV udjela 0,2 %), ekstrakt ružmarina (Oxy'Less.CS udjela 0,2%), ekstrakt ružmarina (Oxy'Less.CS udjela 0,2 %) uz dodatak 0,01% sinergista limunske kiseline, ekstrakt nara (0,2%), mix tokoferola (0,2%);
4. Ispitivanje utjecaja dodatka eteričnih ulja: konopljike (0,05%), lavande (0,05%), slatkog pelina (0,05%), divlje mrkve (0,05%), smilja (0,05%) na produženje održivosti ove mješavine ulja;
5. Ispitati utjecaj dodatka sintetskog antioksidansa propil galata (0,01%) na produženje održivosti mješavine ulja.

Ispitivanje oksidacijske stabilnosti ili održivosti ove mješavine biljnih ulja, te utjecaj dodatka prirodnih i sintetskih antioksidanasa provest će se Oven testom. Ispitivanje se provodi tijekom 4 dana, a promjena oksidacije ulja prati se određivanjem peroksidnog broja svakih 24 sata.

3.2. MATERIJAL I METODE

3.2.1. Materijali

Za ispitivanje u ovom diplomskom radu korištena je mješavina dvaju biljnih ulja. Mješavina je napravljena od hladno prešanog ulja lješnjaka i hladno prešanog ulja koštica grožđa u omjeru 70:30. Za ispitivanje oksidacijske stabilnosti korišteni su prirodni i sintetski antioksidansi, sinergist limunska kiselina.

3.2.1.1. Lješnjakovo ulje

Za određivanje oksidacijske stabilnosti pomoću Oven testa korišteno je hladno prešano ulje lješnjaka. Hladno prešano ulje lješnjaka proizvedeno je prešanjem cijele jezgre u istraživačkom laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu. Korišteni lješnjak za prešanje porijeklom je sa OPG-a Ivan Blaženović, a predstavlja mješavinu dvije sorte Rimski okrugli i Istraski dugi lješnjak u omjeru približno 50:50.

3.2.1.2. Ulje koštica grožđa

Hladno prešano ulje koštica grožđa koje je korišteno za određivanje oksidacijske stabilnosti je dobiveno prešanjem cijelih sjemenki grožđa sorte *Cabernet Sauvignon*. Ulje je prešano na pužnoj preši u istraživačkom laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu.

3.2.1.3. Antioksidansi

Za ispitivanje korišteni su prirodni antioksidansi u obliku ekstrakta (kadulja, ružmarin i nar) i eteričnih ulja (konopljika, lavanda, slatki pelin, divlja mrkva i smilje), te sintetski antioksidans propil galat. Na **Slici 4** prikazani su antioksidansi koji su korišteni za ovo ispitivanje.



Slika 4 Prikaz prirodnih i sintetskih antioksidansa korištenih u ispitivanjima

Prirodni antioksidansi

Ekstrakt kadulje

Listovi biljke kadulje *Salvia officinalis* L. osušeni su i usitnjeni u laboratorijskom mlinu. Nakon usitnjavanja slijedi priprema tinkture. Tinktura je pripremljena u omjeru 1:10, od 10 g usitnjenog materijala s 100 mL 65 % etanola. Tinktura je čuvana na sobnoj temperaturi kroz 96 h u tamnom prostoru, te je povremeno promiješana. Slijedi primjena ultrazvuka frekvencije 37 Hz kroz 60 minuta na 30 °C za pripremu ekstrakta. Potom se provodi filtracija kako bi se uklonile grube čestice i tako dobiveni ekstrakt koncentrira se na rotacijskom vakuumskom uparivaču pri 15 °C do volumena od 10 mL. Dobiveni ekstrakt skladišti se u tamne bočice i čuva na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi za daljnju upotrebu. U ovom ispitivanju smo ga koristili u udjelu 0,2 % računato na masu uzorka ulja.

Ekstrakt ružmarina

Za ispitivanje korišten je ekstrakt ružmarina tip Oxy'Less.CS koji je dobiven iz listova ružmarina *Rosmarinus officinalis* L. koji je proizveden u francuskoj firmi NATUREX. U **Tablici 11** prikazane su specifikacije ekstrakta ružmarina tipa Oxy'Less.CS. U ovom ispitivanju smo ga koristili u udjelu 0,2 % računato na masu uzorka ulja. Također, ispitan je utjecaj ekstrakta ružmarina u udjelu 0,2 % sa dodatkom sinergista limunske kiseline u udjelu od 0,01 % računato na masu uzorka ulja.

Tablica 11 Prikaz specifikacija prirodnog antioksidansa ekstrakta tip Oxy'Less.CS

Specifikacije	
Izgled	prah
Boja	bež
Miris	karakterističan
Topljivost	disperzan u uljima
Analitički parametri kvalitete	
Udio karnosolne kiseline	18 – 22 %
Zaštitni faktor	> 12
Suha tvar	92 – 98 %

Ekstrakt nara 10

Iz voća nara *Punica granatum L.* dobiven je prirodni ekstrakt koji je korišten za ispitivanje. Proizveden je u francuskoj firmi NATUREX. **Tablica 12** prikazuje specifikacije korištenog ekstrakta nara. U ovom ispitivanju smo ga koristili u udjelu 0,2 % računato na masu uzorka ulja.

Tablica 12 Prikaz specifikacija prirodnog antioksidansa ekstrakta nara 10

Specifikacije	
Izgled	prah
Boja	smeđa
Miris	karakterističan
Topljivost	topiv u vodi
Analitički parametri kvalitete	
Udio elagične kiseline	> 10 %
Suha tvar	> 95 %

Mješavina tokoferola 95 (E306)

Mješavina tokoferola 95 je tekućina žute do crveno-smeđe boje bez mirisa. Ova mješavina je proizvedena u američkoj firmi DSM. Mješavina tokoferola dobivena je ekstrakcijom iz klica soje, kukuruza, suncokreta i pšenice. U svome sastavu mješavina sadrži tokoferole u sljedećim udjelima: do 15 % α -tokoferola, < 5 % β -tokoferola, 55 – 57 % γ -tokoferola i 20 – 30 % δ -tokoferola. U ovom ispitivanju smo ga koristili u udjelu 0,2 % računato na masu uzorka ulja.

Eterična ulja

Eterična ulja dobivena su postupkom destilacije, a nabavljena su iz obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva (Mostar).

U ovom ispitivanju smo koristili sljedeća eterična ulja: konopljike, lavande, smilja, slatkog pelina i divlje mrkve u udjelu 0,05 % računato na masu uzorka ulja.

Eterično ulje konopljike

Konopljika *Vitex agnus-castus* L. je grm visine 1 – 2 metra, ljubičasto-plavih cvjetova. Koristi se kao eterično ulje i tinktura. Plodovi konopljike sadrže bioaktivne komponente: flavonoide, iridoidne glikozide, eterična ulja i terpenoide. Upravo flavonoidi su najveća grupa fenolnih spojeva koji imaju antioksidacijsko djelovanje.

Eterično ulje lavande

Lavanda *Lavandula angustifolia* L. je grm koji ima ljubičaste cvjetove prepoznatljivog mirisa. Eterično ulje dobija se destilacijom cvijeta lavande. Glavni sastojci eteričnog ulja lavande su: linalol (alkoholi) i linalilacetat (esteri). Eterično ulje ima antioksidacijsko djelovanje zbog fenolnog sastava.

Eterično ulje smilja

Smilje *Helichrysum italicum* L. je trajnica prepoznatljivih žutih cvjetova. U kemijskom sastavu ističu se hlapljive komponente esteri i alkoholi, koji posjeduju antioksidacijsku aktivnost.

Eterično ulje slatkog pelina

Slatki pelin *Artemisia annua* L. je biljka čiji listovi izgledom podsjeća na paprat. Uzgaja se širom svijeta, ali potječe iz Kine. Glavne komponente koje se ističu u sastavu su: artemizija keton, 1,8-cineol i kamfor.

Eterično ulje divlje mrkve

Eterično ulje dobije se destilacijom sjemenki divlje mrkve *Daucus carota* L. izrazito je cijenjeno eterično ulje divlje mrkve. U sastavu dominiraju seskviterpenski alkoholi (daukol i karotol), monoterpeni i esteri. Ovo eterično ulje ima antioksidacijsko djelovanje zbog visokog udjela fenolnih spojeva.

Sintetski antioksidansi

Propil galat (E310)

Propil galat je sintetski antioksidans koji se često koristi u kombinaciji s TBHQ (E319), BHA (E320) i BHT (E321) kako bi se postiglo što bolje antioksidacijsko djelovanje. Dolazi u obliku praha koji je sivo-bijele boje, te je proizveden u firmi DANISCO. Propil galat se dobije iz biljnih spojeva esterifikacijom galne kiseline. U ovom ispitivanju smo ga koristili u udjelu 0,01 % računato na masu uzorka ulja.

Sinergist limunska kiselina

Limunska kiselina je korištena u ovom istraživanju u udjelu 0,01 % računato na masu ulja.

3.2.2. Metode rada

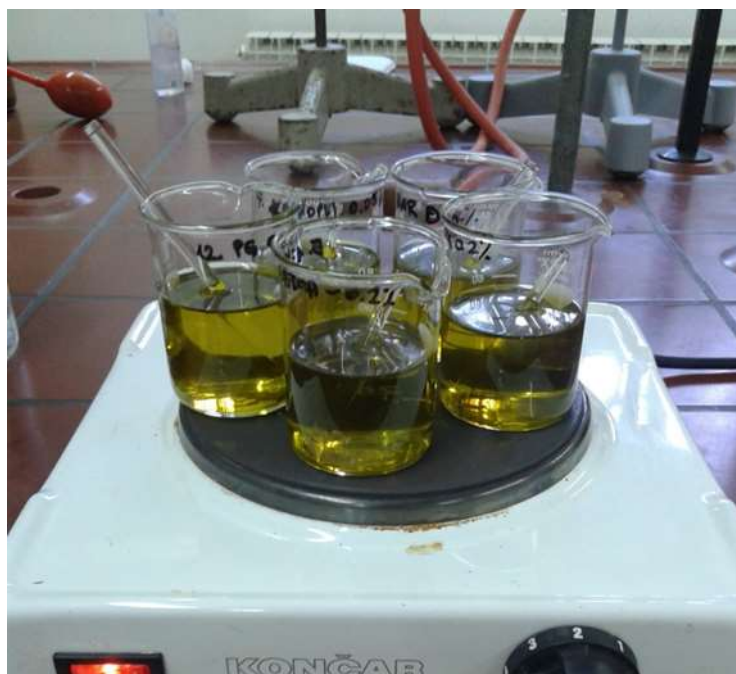
3.2.2.1. Priprema uzorka za analizu

Prije ispitivanja oksidacijske stabilnosti ulja pripremljena je mješavine dvaju hladno prešanih biljnih ulja. Mješavina se sastoji od 70 % ulja lješnjaka i 30 % ulja koštica grožđa koja je homogenizirana miješanjem. Nakon toga slijedi priprema uzorka ulja i dodanog antioksidansa. Uzorci ulja pripremljeni su na način da je u čašice odvagano 50 g mješavine prethodno pripremljenog ulja. Zatim je odvaganim uzorcima dodana određena količina pojedinačnog prirodnog i sintetskog antioksidansa u udjelima računato na masu uzorka koji su prikazani u **Tablici 13.**

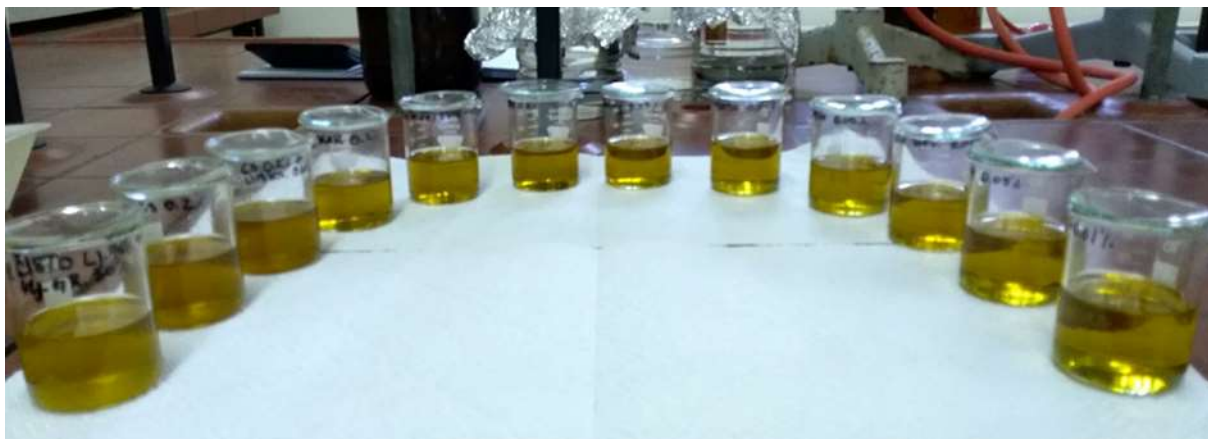
Tablica 13 Prikaz dodanih prirodnih i sintetskih antioksidanasa u ispitivani uzorak ulja

Antioksidans	Udio dodanog antioksidansa (%)
Ekstrakt ružmarina (Oxy'Less.CS)	0,2
Ekstrakt ružmarina (Oxy'Less.CS) + 0,01 % limunske kiseline	0,2
Ekstrakt nara 10	0,2
Ekstrakt kadulje	0,2
Mješavina tokoferola 95	0,2
Eterično ulje konopljike	0,05
Eterično ulje lavande	0,05
Eterično ulje slatki pelin	0,05
Eterično ulje divlje mrkve	0,05
Eterično ulje smilja	0,05
Propil galat	0,01

Nakon vaganja određene količine antioksidansa, izvagani antioksidansi dodaju se u uzorke ulja i dobro promiješaju staklenim štapićem. Provodi se miješanje uz zagrijavanje na temperaturi od 70 do 80 °C kako bi smjesa postala homogena. Homogenizacija se provodi uz održavanje postignute temperature u trajanju od 30 minuta (**Slika 5**).

**Slika 5** Prikaz zagrijavanja i homogenizacije uzorka ulja s dodanim antioksidansom

Potom se uzorci ohlade na sobnu temperaturu, pokriju se satnim stakalcem. Uzorci za ispitivanje prikazani su na **Slici 6**. Čašice ulja bez dodatka antioksidansa i s dodatkom antioksidansa stavljaju se u prethodno zagrijan sušionik na 63 °C čime započinje ispitivanje oksidacijske stabilnosti mješavine ulja.



Slika 6 Uzorci za ispitivanje oksidacijske stabilnosti Oven testom

3.2.2.2. Određivanje parametara kvalitete ulja

Određivanje peroksidnog broja (Pbr)

Peroksidni broj se određuje kako bi se odredio stupanj oksidacijskog kvarenja ulja. Pomoću ove metode ispituju se nastali primarni produkti oksidacije biljnih ulja. Peroksidni broj određen je standardnom metodom HRN EN ISO 3960:2007 Određivanje peroksidnog broja - Jodometrijsko određivanje točke završetka (HZN, 2007.). Izvaže se 1 g uzorka ulja koji se potom otopi u otopini ledene octene kiseline i kloroforma. Nakon toga dodaje se otopina kalij-jodida (KI). Jod se oslobađa iz otopine kalij-jodida djelovanjem peroksida. Oslobođeni jod se određuje tiracijom s natrij-tiosulfatom ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) uz dodatak škorba kao indikatora (**Slika 7**). Kada dođe do promjene boje titracija je završena. Prema sljedećoj formuli izračunava se peroksidni broj:

$$Pbr \text{ (mmol } O_2/\text{kg)} = \frac{(V_1 - V_2) \times 5}{m}$$

V_1 – volumen otopine natrij-tiosulfata, $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,01 \text{ mol/L}$ utrošen za titraciju uzorka ulja, (mL);

V_2 – volumen otopine natrij-tiosulfata, $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,01 \text{ mol/L}$ utrošen za titraciju slijepe probe, (mL);

m – masa uzorka ulja, (g).



Slika 7 Određivanje peroksidnog broja u uzorcima mješavine ulja

Određivanje slobodnih masnih kiselina (SMK)

Slobodne masne kiseline u uzorcima mješavine ulja određene su standardnom metodom HRN EN ISO 660: 1996 Određivanje kiselinskog broja i kiselosti (HZN, 1996.). koja se temelji na principu titracije s otopinom natrij-hidroksida $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/L}$. U 5 g izvaganog uzorka ulja dodano je 50 mL neutralne smjese etera i etanola, te je provedena homogenizacija. Nakon homogenizacije dodano je nekoliko kapi indikatora fenolftaleina te je provedena titracija. Kada je došlo do promjene boje titracija je završena. U rezultatu izražene su slobodne masne kiseline kao udjel (%) izračunat kao udio oleinske kiseline prema sljedećoj jednadžbi:

$$SMK (\% \text{ oleinske kiseline}) = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

V - utrošak otopine natrij-hidroksida za titraciju uzorka, (mL);

c - koncentracija otopine natrij-hidroksida za titraciju uzorka, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/L}$;

M - molekulska masa oleinske kiseline, $M = 282 \text{ g/mol}$;

m - masa uzorka ulja za ispitivanje, (g).

3.2.2.3. Određivanje oksidacijske stabilnosti mješavine ulja Oven testom na 63°C

Oven test provodio se na uzorku mješavine biljnih ulja bez dodatka antioksidansa, te na uzorcima mješavine biljnih ulja sa dodatkom pojedinog antioksidansa. Upotrebljeni su pojedinačni prirodni antioksidanasi u obliku ekstrakta i eteričnih ulja, te sintetski antioksidans propil galat kao što je prikazano u **Tablici 13**. Ispitan je i uzorak u kojem je osim ekstrakta ružmarina dodana i limunska kiselina u udjelu od 0,01 % računato na masu uzorka. Uzorci s antioksidansima i bez antioksidansa stavljeni su u prethodno zagrijani sušionik na temperaturu od 63°C (**Slika 8**). Peroksidni broj je određen na početku prije provođenja Oven testa. Nakon 24 sata testa uzorci se izvade radi uzimanja uzorka za ispitivanje peroksidnog broja. Oven test se provodio 4 dana, tijekom kojih je svakih 24 sata rađeno određivanje peroksidnog broja na uzorcima. Dobiveni rezultati Oven testa prikazani su kao vrijednost peroksidnog broja (mmola O_2/kg).



Slika 8 Prikaz uzoraka mješavine ulja za ispitivanje u sušioniku na 63 °C

4.REZULTATI

Osnovni parametri kvalitete hladno prešanog ulja lješnjaka, hladno prešanog ulja koštica grožđa i njihove mješavine (lješnjakovo ulje 70 %, ulje koštica grožđa 30 %) prikazani su u Tablici 14.

Tablica 14 Rezultati ispitivanja osnovnih parametara kvalitete korištenog hladno prešanog ulja lješnjaka i hladno prešanog ulja koštica grožđa i njihove mješavine (70:30) prije provedenog Oven testa

Uzorak ulja	Pbr (mmol O ₂ /kg)	SMK (% oleinske kiseline)
Hladno prešano ulje lješnjaka	0	0,30
Hladno prešano ulje koštica grožđa	3,22	0,19
Mješavina ovih biljnih ulja	1,47	0,24

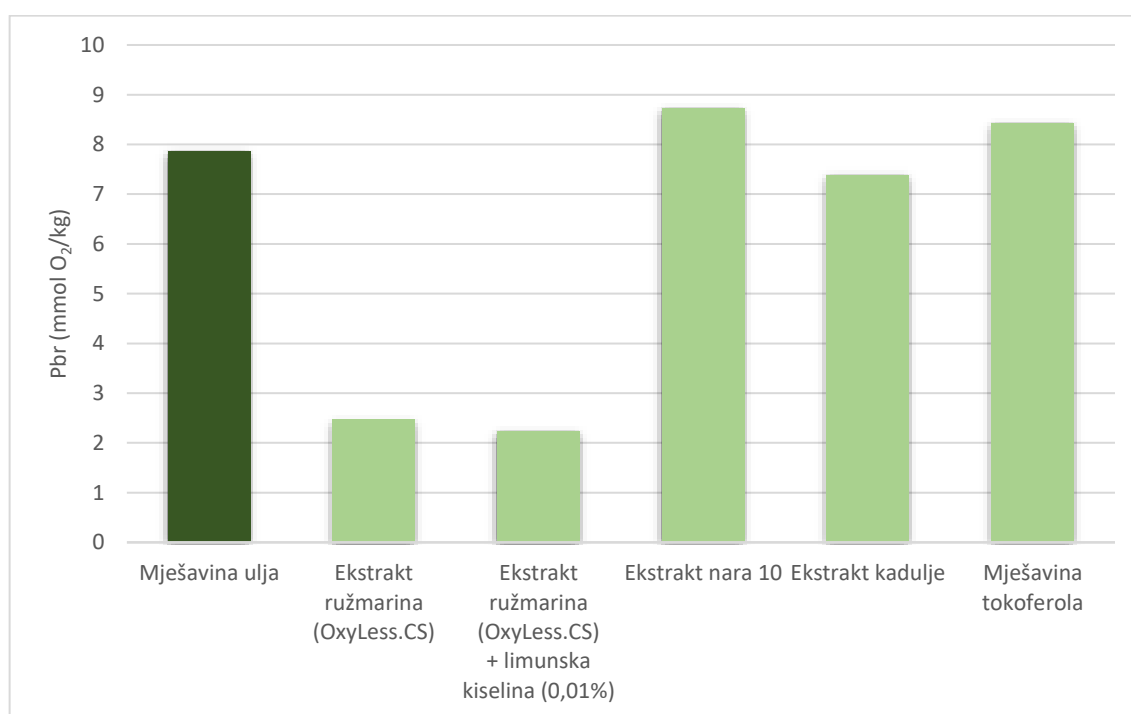
Pbr – peroksidni broj, (mmol O₂/kg)

SMK – slobodne masne kiseline, (% oleinske kiseline)

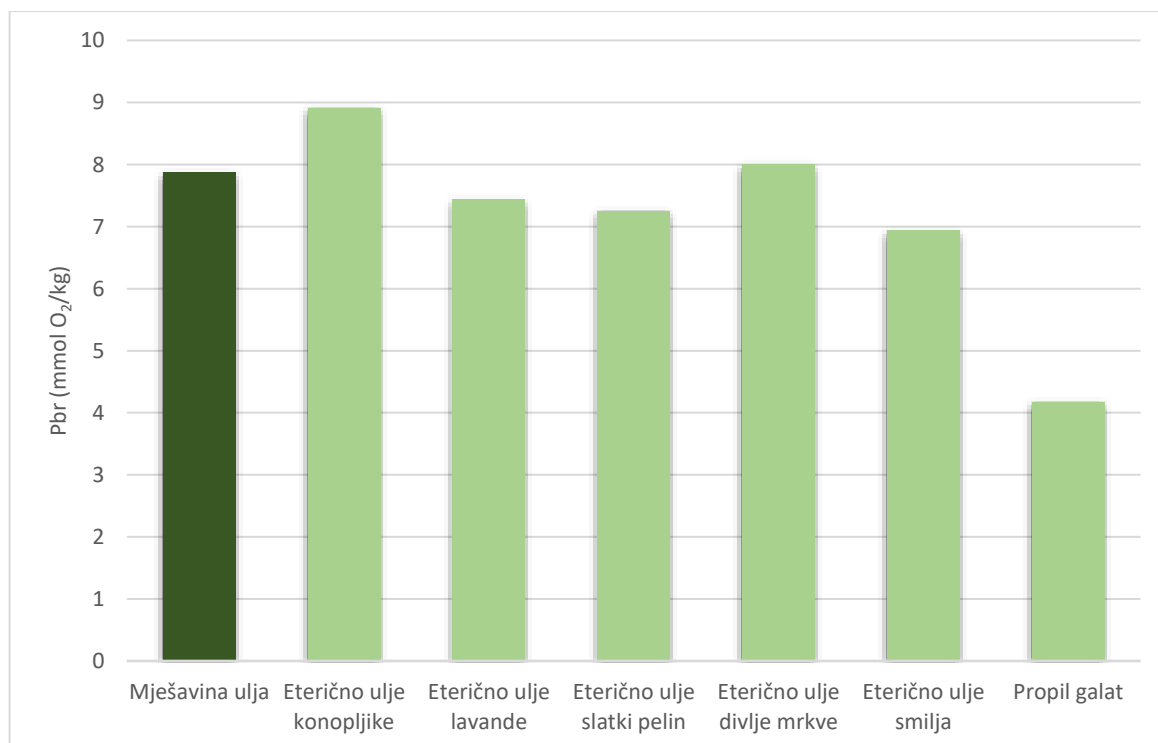
Određivanje oksidacijske stabilnosti mješavine ulja Oven testom na 63 °C

Tablica 15 Utjecaj dodatka antioksidanasa i sinergista na promjenu oksidacijske stabilnosti mješavine ulja Vrijednosti peroksidnog broja ispitivanog tijekom 4 dana Oven testom

Uzorci		Udio antioksidansa (%)	Pbr (mmol O ₂ /kg)				
			0. dan	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan
1.	Mješavina ulja (kontrolni uzorak)	-	1,47	2,46	3,45	4,85	7,87
2.	Ekstrakt ružmarina (Oxy'Less.CS)	0,2		1,49	1,96	2,45	2,47
3.	Ekstrakt ružmarina (Oxy'Less.CS) uz 0,01 % limunske kiseline	0,2		1,74	2,23	2,18	2,24
4.	Ekstrakt nara 10	0,2		2,43	3,92	5,89	8,74
5.	Ekstrakt kadulje	0,2		2,48	3,70	4,95	7,39
6.	Mješavina tokoferola	0,2		2,17	3,88	5,94	8,42
7.	Eterično ulje konopljike	0,05		2,91	3,96	4,90	8,91
8.	Eterično ulje lavande	0,05		1,71	4,41	6,41	7,43
9.	Eterično ulje slatki pelin	0,05		2,44	3,00	5,37	7,25
10.	Eterično ulje divlje mrkve	0,05		2,42	3,91	4,93	8,00
11.	Eterično ulje smilja	0,05		1,94	3,40	4,93	6,93
12.	Propil galate (PG)	0,01		1,70	2,20	3,96	4,17



Slika 9 Utjecaj dodatka prirodnog antioksidansa (ekstrakta) na oksidacijsku stabilnost mješavine lješnjakovog ulja i ulja koštica grožđa (70:30) nakon 4 dana Oven testa



Slika 10 Utjecaj dodatka prirodnog (eteričnog ulja) i sintetskog antioksidansa na oksidacijsku stabilnost mješavine lješnjakovog ulja i ulja koštica grožđa (70:30) nakon 4 dana Oven testa

5.RASPRAVA

Rezultati ispitivanja osnovnih parametara kvalitete hladno prešanog ulja lješnjaka, hladno prešanog ulja koštica grožđa te njihove mješavine u omjeru 70:30 prikazani su u **Tablici 14**. Ispitivani parametri kvalitete peroksidni broj (Pbr) i slobodne masne kiseline (SMK) imaju vrijednosti koje su u skladu s Pravilnikom o jestivim uljima i mastima (NN 11/2019). U **Tablici 15** i na **Slikama 9** i **10** vidljivi su rezultati ispitivanja utjecaja dodataka prirodnih i sintetskih antioksidanasa te sinergista na promjenu oksidacijske stabilnosti mješavine hladno prešanog ulja lješnjaka i ulja koštica grožđa (70:30). Oksidacijska stabilnost ispitivana je Oven testom tijekom 4 dana pri temperaturi od 63 °C. Mješavina ulja ima početnu vrijednost Pbr 1,47 mmol O₂/kg ulja. Tijekom testa dolazi do postepenog porasta vrijednosti Pbr te se nakon 4 dana testa dobila vrijednost 7,87 mmol O₂/kg. Dodatkom pojedinačnog prirodnog antioksidansa ekstrakata (0,2 %) u mješavinu ulja došlo je do promjene oksidacijske stabilnosti. Korištenjem ekstrakata nara kao i mješavine tokoferola udjela 0,2 % nije se postigla stabilizacija mješavine ulja već je nakon 4 dana testa došlo do porasta vrijednosti Pbr u odnosu na kontrolni uzorak. To znači da ni prirodni antioksidansi ne pokazuju zaštitu ove mješavine od oksidacijskog kvarenja. Ekstrakt kadulje (0,2 %) pokazuje slabu zaštitu mješavine ulja od oksidacijskog kvarenja, nakon 4 dana testa dobivena je malo manja vrijednost Pbr (7,39 mmol O₂/kg) u odnosu na kontrolni uzorak. Međutim primjenom ekstrakta ružmarina (tip Oxy'Less.CS), udjela 0,2 % postignuta je značajna zaštita mješavine ulja, nakon 4 dana testa vrijednost Pbr je 2,47 mmol O₂/kg. Limunska kiselina (0,01 %) dodana je u funkciji sinergista uz ekstrakt ružmarina što dovodi do još većeg smanjenja vrijednosti Pbr mješavine ulja nakon 4 dana testa (2,24 mmolO₂/kg). To znači da limunska kiselina efikasno pomaže ekstraktu ružmarina da poveća stabilnost ulja tj. povećava otpornost prema oksidacijskom kvarenju (**Slika 9**). Ispitivanje utjecaja dodatka prirodnog antioksidansa eteričnog ulja (0,05 %) i sintetskog antioksidansa propil galata (0,01 %) na promjenu oksidacijske stabilnosti mješavine ulja prikazano je u **Tablici 15** i na **Slici 10**. Rezultati testa pokazuju da se primjenom eteričnog ulja konopljike i eteričnog ulja divlje mrkve nije postigla zaštita mješavine ulja od oksidacijskog kvarenja, nakon 4 dana testa dobivena je veća vrijednost Pbr u odnosu na kontrolni uzorak. Korištenjem eteričnog ulja lavande i eteričnog ulja slatkog pelina ostvarena je mala zaštita mješavine ulja od oksidacijskog kvarenja jer je nakon 4 dana testa Pbr bio malo viši od kontrolnog uzorka. Eterično ulje smilja najbolje štiti mješavinu ulja od oksidacije, nakon 4 dana testa dobivena je vrijednost Pbr niža (6,93 mmol O₂/kg) u odnosu na primjenu drugih ispitivanih eteričnih ulja. Sintetski antioksidans propil galat (0,01 %) pokazuje značajnu efikasnost zaštite mješavine ulja te uspješno stabilizira ovo ulje, poveća mu održivost.

6.ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja koje je provedeno u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Ispitivani prirodni i sintetski antioksidansi te sinergist limunska kiselina utječu na promjenu oksidacijske stabilnosti mješavine ulja.
2. Dodatkom ekstrakta ružmarina (tip Oxy'Less.CS) postignuta je najbolja zaštita mješavine ulja od oksidacijskog kvarenja.
3. Primjenom limunske kiseline uz ekstrakt ružmarina zapaženo je sinergističko djelovanje, te je još dodatno povećana zaštita mješavine ulja od oksidacije.
4. Ekstrakt kadulje neznatno povećava stabilnost mješavine ulja.
5. Ekstrakt nara i mješavina tokoferola u udjelu 0,2 % ne pokazuju zaštitu mješavine ulja od oksidacijskog kvarenja.
6. Eterična ulja dodana u mješavinu ulja u funkciji prirodnog antioksidansa ne pokazuju značajnu zaštitu od oksidacijskog kvarenja.
7. Najbolja zaštita mješavine ulja postignuta je dodatkom eteričnog ulja smilja.
8. Podjednaka efikasnost zaštite mješavine ulja vidljiva je dodatkom eteričnog ulja lavande i slatkog pelina.
9. Dodatkom eteričnog ulja konopljike i divlje mrkve nije postignuta zaštita mješavine ulja
10. Sintetski antioksidans propil galat značajno štiti mješavinu ulja od oksidacijskog kvarenja.

7.LITERATURA

- Alasalvar C, Amaral JS, Shahidi F: Functional lipid characteristics of Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Journal of Agricultural Food Chemistry* 54(26):10177-10183, 2006.
- Bandoniene D, Pukalskas A, Venskutonis P R, Gruzdiene D: Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. *Food Res. Int.* 33(7):785-791, 2000.
- Berra D, Lahiri D, Nag A: Studies on a natural antioxidant for stabilization of edible oil and comparison with synthetic antioxidants. *Journal of Food Engineering* 74(4): 542-545, 2006.
- Bockisch M: *Fats and oils handbook*. AOCS Press, Champaign, Illinois, 1998.
- Crapiste GH, Brevedan MIV, Carelli A A: Oxidation of Sunflower Oil During Storage. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76(12): 1437-1443, 1999.
- Dimić E, Turkulov J: *Kontrola kvaliteta u tehnologiji jestivih ulja*. Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2000.
- Dimić E: *Hladno ceđena ulja*. Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2005.
- Domokos J, Kiss B: Néhány szempont a szőlőfeldolgozás melléktermékeinek hasznosításához. *Olaj Szappan Kozmetika* 51(3):113-115, 2002.
- Frega N, Mozzon M, Lercker G: Effect of Free Fatty Acids on Oxidative stability of Vegetable oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76(3):325-329, 1999.
- Hussein S, Abdrabba S: Physico-chemical characteristics, fatty acid, composition of grape seed oil and phenolic compounds of whole seeds, seeds and leaves of red grape in Libya. *International Journal of Applied Science and Mathematics* 2(5):2394 – 2894, 2015.
- HZN, Hrvatski zavod za norme: *Životinjske i biljne masti i ulja – Određivanje kiselinskog broja i kiselisti*. HRN EN ISO 660:1996.
- HZN, Hrvatski zavod za norme: *Životinjske i biljne masti i ulja – Određivanje peroksidnog broja – Jodometrijsko određivanje točke završetka*. HRN EN ISO 3960:2007.
- Jokić S, Moslavac T, Aladić K, Bilić M, Ačkar Đ, Šubarić D: Hazelnut oil production using pressing and supercritical CO₂ extraction. *Hemijska Industrija* 70(4):359-366, 2016.
- Karleskind A: *Oils and fats Manual, Volumen 1*. Intercept Ltd, Andover, Hampshire, UK, 1996.
- Koprivnjak O: *Djevičansko maslinovo ulje od masline do stola*. Poreč, 2006.
- List GR, Evans CD, Kwolek WF, Warner K, Boundy BK: Oxidation and Quality of Soybean Oil: A Preliminary Study of the Anisidine test. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 51(2):17-21, 1974.
- Maguire LS, O'Sullivan SM, Galvin K, O'Connor TP, O'Brien NM: Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 55(3):171 -178, 2004.
- Miyashita K, Takagi T: Study on the oxidative rate and prooxidant activity of free fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63(10):1380-1384, 1986.

- Moslavac T: *Tehnologija ulja i masti*, Interna skripta. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.
- MPRR, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH: *Pravilnik o jestivim uljima i mastima*. Narodne novine 11/19, 2019.
- MZSS, Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi RH: *Pravilnik o prehrambenim aditivima*. Narodne novine 62/10, 2010.
- Oštrić-Matijašević B, Turkulov J: *Tehnologija ulja i masti I deo*. Tehnološki fakultet, Novi Sad, 1980.
- Özcan Musa M, Arslan D: Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils. *Food Chemistry* 129(1):171-174, 2011.
- Pokorny J, Nguyen TT, Korczak J: Antioxidant activities of rosemary and sage extracts in sunflower oil. *Nahrung* 41:176-177, 1997.
- Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M: *Antioxidants in food*. Woodhead Publishing Limited, USA, 2001.
- Rac M: *Ulja i masti*. Poslovno udruženje proizvođača biljnih ulja. Beograd, 1964.
- Rade D, Mokrovčak Ž, Štrucelj D: *Priručnik za vježbe iz kemije i tehnologije lipida*. Durieux, Zagreb, 2001.
- Rade D, Škevin D: Maslinovo ulje i zdravlje – važnost maslinovog ulja u prehrani. *Popularni stručni članci iz područja PBN – a*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, 2004.
- Sabir A, Unver A, Kara Z: The fatty acid and tocopherol constituents of the seed oil extracted from 21 grape varieties (*Vitis* spp.). *Journal of the science of food and agriculture* 92(9):1982-1987, 2012.
- Sadadinović J: *Organska tehnologija*. Ars grafika, Tuzla, 2008.
- Schieber A, Müller D, Röhrig G, Carle R: Influence of grape cultivar and processing method on the quality of cold-pressed grape seed oils. *Mitteilungen Klosterneuburg* 52(1):29–33, 2002.
- Schuster WH: *Ölpflanzen in Europa*. DLG-Verlag, Frankfurt am Main, 240, 1992.
- Shahidi F, Zhong Y: *Antioxidants: Regulatory status*. U: F. Shahidi: *Bailey's Industrial Oil and Fats Products* 6th Edition, str. 491-509. Newfoundland, Canada, 2005.
- Sikorski ZE: *Chemical and functional properties of food components*. CRC Press, USA, 2003.
- Swern D: *Industrijski proizvodi ulja i masti po Baileyu*. Nakladni zavod Znanje, Zagreb, 1972.
- Vaughan JG: *The Structure and utilization of oil seeds*. Chapman and Hall Ltd, London, 1977.
- Vidyasagar K, Arya SS, Premavalli KS, Parihar DB, Nath H: Chemical and nutritive changes in refined groundnut oil during deep fat frying. *Journal of Food Science and Technology* 11(2):73-75, 1974.

Volmut K: *Oksidacijska stabilnost biljnih ulja s dodatkom propil galata i ekstrakta ružmarina*. Specijalistički rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2010.

Vrbaški Ž: *Odabrana poglavlja tehnologije ulja i masti*. Viša tehnološka škola, Zrenjanin, str. 24, 1972.

Wetherilt H, Pala M: *Hazelnut Composition and Possible Health Implications, U The proceedings of the World Conference on Oilseed and Edible Oils Processing*, str. 218-227. AOCS Press, Champaign, Ill ., 1998.

Yanishlieva NV, Marinova EM: Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103(11):752–767, 2001.

Yilmaz E, Öğütcü M: Properties and Stability of Hazelnut Oil Oganonels with Beeswax and Monoglyceride. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 91(6):1007-1017, 2014.

Zlatanov MD, Antova GA: Lipid composition of nuts from almond, hazelnut and walnut. *Scientific Works HFFI-Plovdiv*, Jubille Scientific Conference „DFSTT-98“ Vol. XLII:1-5, 1998.